Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Philipps-Universität Marburg

Über die Wirkung von Nor-N-LOST, Stickstoff-LOST (HN_2) und dem primären, cytostatisch aktiven Metaboliten des Cyclophosphamids auf die Zellproliferation, die Nukleinsäure- und Proteinbiosynthese von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen in Zellkultur

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von
Ulrich Roßbach
aus Laubach

Marburg/Lahn 1972

Fotodruck E. Symon · 355 Marburg/Lahn · Friedrichstr. 3

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Philipps-Universität Marburg

Über die Wirkung von Nor-N-LOST, Stickstoff-LOST (HN_2) und dem primären, cytostatisch aktiven Metaboliten des Cyclophosphamids auf die Zellproliferation, die Nukleinsäure- und Proteinbiosynthese von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen in Zellkultur

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von
Ulrich Roßbach
aus Laubach

Marburg/Lahn 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Universität Marburg am 1.8.1972

gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs

Dekan : Prof. Dr. med. H. Oepen
Referent : Prof. Dr. med. Dr. phil. H.-J. Hohorst
Korreferent : Prof. Dr. med. D. Schachtschabel

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	6
2.1	Präparation des primären, cytostatisch aktiven Metaboliten des Cyclophosphamids ("M-cyclophosphamid")	6
2.2	Ehrlich-Ascites-Tumorzellen	6
2.3	Kulturmedium	8
2.4	Züchtung von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen in Zellkultur, Wachstumsverhalten	9
2.5	Inkubationsexperimente an Zellkulturen mit Nor-N-LOST, Stickstoff-LOST und M-cyclophosphamid	11
2.6	Bestimmung von Zellzahl und Trypanblau-Färbbarkeit	11
2.7	Bestimmung des Einbaus von ^{14}C-Leucin, ^{14}C-Thymidin und ^{14}C-Uridin	12
2.8	Bestimmung des Proteingehaltes von Zellkulturen	13
2.9	Bestimmung des DNS- und RNS-Gehaltes von Zellkulturen	13
2.9.1	Aufarbeitung der Kulturen und Hydrolyse	13
2.9.2	DNS-Bestimmung	14
2.9.2	RNS-Bestimmung	15
2.10	Reagenzien und Geräte	15
3.	Ergebnisse	17
3.1	Dosis-Wirkungskurven	17
3.2	Proteingehalt und Zellzahl der Kulturen, zellulärer Proteingehalt	24
3.3	Trypanblau-Färbbarkeit	27
3.4	DNS- und RNS-Gehalt der Kulturen	28

3.5	Protein/DNS- und RNS/DNS-Quotienten	3
3.6	Pulsmarkierung der Kulturen mit ^{14}C-Leucin, ^{14}C-Thymidin und ^{14}C-Uridin	3
4.	Diskussion	3
5.	Zusammenfassung	4
6.	Literaturverzeichnis	4
	Anerkennung	5
	Lebenslauf	5
	Akademische Lehrer	5

Abkürzungsverzeichnis

μCi	Mikro-Curie
DL_5 / DC_{95}	Quotient aus der Dosis, die bei 5 % der Versuchstiere eine letale Wirkung zeigt, und der Dosis, die bei 95 % der Versuchstiere eine curative Wirkung zeigt
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ED_{50}	Dosis oder Konzentration, bei der 50 % einer Maximalwirkung erreicht werden
h	Stunden
Ipm	bei der Flüssigkeitsscintillationszählung registrierte Impulse pro Minute
N	Anzahl der Einzelmessungen
Dimethyl-POPOP:	1,4-bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol
PPO	2,5-diphenyloxazol
RNS	Ribonukleinsäure

1. Einleitung

Das Problem des Wirkungsmechanismus von cytotoxischen und speziell cancerotoxischen Substanzen ist unzertrennbar mit dem der Spezifität und Selektivität der Wirkung verknüpft, und zwar sowohl aus dem Gesichtswinkel des Theoretikers als auch unter klinischen Aspekten. Als ein Vertreter solcher Substanzen wurde Stickstoff - LOST (HN_2), dessen cytotoxische Eigenschaft seit dem Ende des vergangenen Jahrhunderts bekannt ist [16, 33], im Jahre 1942 erstmals als Cytostatikum an einem Krebskranken erprobt [21, 22]. Wegen der hohen und generellen cytotoxischen Aktivität und der geringen Tumorspezifität waren einer klinischen Anwendung des Stickstoff-LOST zu enge Grenzen gesetzt. Auf der Suche nach Substanzen mit einem günstigeren Verhältnis zwischen curativen und toxischen Effekten wurden Derivate des Stickstoff - LOST - Moleküls synthetisiert und untersucht [5, 20, 29]. Dabei erwiesen sich zyklische N - LOST - Phosphamidester, wie z. B. das Cyclophosphamid ^{R}, wegen ihrer cytostatischen Wirkung bei relativ guter Allgemeinverträglichkeit zur Chemotherapie als besonders geeignet [1, 23]. Die "Wirkformen" dieser Verbindungen entstehen jedoch erst nach einem "Aktivierungs"-Metabolismus, der vorwiegend in der Leber stattfindet [7, 8, 26]. Das Cyclo - phosphamid hat als Vertreter dieser Gruppe alkylierender Substanzen inzwischen eine breite klinische Anwendung in der Therapie maligner Neoplasien gefunden; die Probleme seines Wirkungs - mechanismus bedürfen aber trotz vieler bereits vorliegender Untersuchungen noch weiterer Aufklärung.

Der Reaktionsmechanismus der alkylierender Substanzen in der

R Endoxan, Asta - Werke, Brackwede / Bielefeld

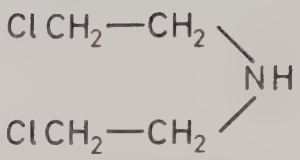
Zelle scheint im Prinzip klar zu sein: Es werden nukleophile Zentren, insbesondere Schwefel-, Stickstoff- und Sauerstoffatome alkyliert. Aber die Frage, wie und wo diese letzte Reaktion in der Targetzelle erfolgt und welche Moleküle, vor allem Makromoleküle, alkyliert werden müssen, um die Tumorzelle zum Absterben zu bringen, (ohne gleichzeitig "normale" Zellen irreversibel zu schädigen), ist noch völlig offen. Allerdings erscheint bei derart reaktionsfähigen Substanzen, wie den alkylierenden Stickstoff - LOST - Verbindungen, die Suche nach dem für die Cytostase von Tumorzellen "letztlich" verantwortlichen Ereignis wenig aussichtsreich.

Um den Wirkungsmechanismus einer cancero-toxischen Substanz analysieren zu können, sollte ein solches Cytostatikum relativ spezifisch Tumorzellen und weniger normales Gewebe treffen und in seiner chemischen Reaktionsfähigkeit möglichst so weit reduziert sein, daß innerhalb der Zeit bis zum Eintritt des biologischen Effekts der Eigenmetabolismus des Cytostatikums übersichtlich ist und somit die Struktur des am Wirkort in der Zelle in Reaktion tretenden " ultimate cytotoxic metabolite " [25] aufgeklärt ist bzw. mit hoher Wahrscheinlichkeit angegeben werden kann. Weiterhin erscheint es sinnvoll, mehrere cytotoxische Substanzen einer Verbindungsklasse (wie z. B. Stickstoff - LOST - Verbindungen), aber mit verschiedener chemischer Reaktivität und Selektivität des cytostatischen Effekts, in ihrer Wirkung auf geeignete Tumorzellen miteinander zu vergleichen und zu prüfen, ob Beziehungen zwischen der Selektivität der Wirkung oder der Reaktivität des Cytostatikums einerseits und einer unterschiedlichen Beeinflussung der gemessenen Zellparameter andererseits bestehen. Voraussetzung ist, daß der Reaktionsmechanismus der verglichenen cyto- bzw. cancero-toxischen Substanzen

am Wirkort der gleiche ist und die Modifikationen der chemischen Struktur lediglich die Reaktionskinetik oder andere physikalisch-chemische Eigenschaften, wie z. B. Löslichkeit und Verteilung zwischen Wasser - und Lipidphasen, betreffen.

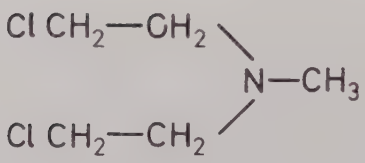
Die für die vorliegende Arbeit gewählten drei Cytostatika der Stickstoff - LOST - Gruppe, nämlich Bis- (ß-chloräthyl)-amin (Nor-N-LOST), N-methyl-bis-(ß-chloräthyl)-amin (Stickstoff-LOST, HN_2) und der primäre, cytostatisch aktive Metabolit des Cyclosphosphamid: N-bis-(ß-chloräthyl)-phosphorsäurediamid-O-(ß-formyläthyl)-ester [24, 25] (Abkürzung: M-cyclosphosphamid), scheinen im Hinblick auf die vorgenannten Bedingungen für eine solche Untersuchung geeignet: Die chemische Reaktivität, gemessen an der Chlorid-Ionenfreisetzung aus der ß-Chloräthylamin-Funktion ist beim Stickstoff - LOST deutlich größer als bei Nor-N-LOST und diese wiederum größer als bei M-cylophosphamid [2, 24, 28]. Der therapeutische Index (Quotient DL_5/DC_{95}, s. Abkürzungsverzeichnis) beträgt bei der Ratte mit festem Yoshida-Sarkom für Stickstoff - LOST 0.8, für Nor-N-LOST 0.65 und für M-cyclophosphamid ca. 8.5 [6], wobei wegen einer noch ausstehenden Ermittlung für M-cyclophosphamid der Minimalwert von Cyclophosphamid eingesetzt wurde. Dabei wird vorausgesetzt, daß der primäre Metabolit (M-cyclophosphamid) der quantitativ allein ins Gewicht fallende Träger der cytostatischen und cytotoxischen Wirkung des Cyclophosphamid in vivo ist. [26, 27].

Durch Untersuchungen anderer Autoren wurde die Wirkung von alkylierenden Stickstoff - LOST - Verbindungen (insbesondere von Stickstoff - LOST) auf den zellulären Nukleinsäure- und Proteinstoffwechsel gezeigt [12, 30]. So wurde nach Stickstoff-



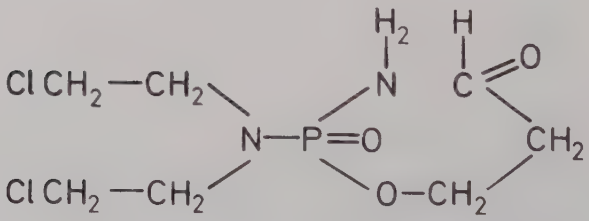
Nor-N-LOST

Bis-(ß-chloräthyl)-amin



Stickstoff-LOST (HN_2)

N-methyl-bis-(ß-chloräthyl)-amin



M-cyclophosphamid

N-bis-(ß-chloräthyl)-phosphorsäurediamid-O-(ß-formyläthyl)-ester

Abbildung 1.

LOST - Behandlung eine Inhibition der Mitose festgestellt, wobei jedoch der DNS- Gehalt dieser Zellen noch bis auf das Zweifache anstieg [10]. Auch Veränderungen des Protein- und RNS- Stoffwechsels von mit Stickstoff - LOST behandelten Zellen wurde beschrieben [17]. Es ist jedoch keineswegs geklärt, ob diese Wirkungen auf den Nukleinsäure- und Proteinstoffwechsel primäre Effekte dieser Stickstoff- LOST - Verbindungen darstellen oder die unspezifische Folge eines anderen Angriffspunktes (z.B. an der Zellmembran) sind.

Zur Analyse des Angriffspunktes und der Wirkungsweise von cytostatischen Substanzen auf zellulärer Ebene eigenen sich besonders Zellkulturen, da sie eine exakte Applikation und eine relativ übersichtliche Untersuchung der Einwirkung der zu testenden Substanz auf Stoffwechselleistungen von wachsenden und sich vermehrenden Zellpopulationen ermöglichen. Bisher liegen noch keine Untersuchungen über die Wirkung des M-cyclophosphamid im Vergleich mit Stickstoff - LOST (HN_2) bzw. Nor-N-LOST auf den Nukleinsäure- und Proteinstoffwechsel von Zellkulturen vor. In der vorliegenden Arbeit soll mit biochemischer und cytologischer Methodik die Wirkung dieser drei Substanzen auf das Wachstum, den Nukleinsäure - und Proteinstoffwechsel von Zellkulturen des Ehrlich - Ascites-Tumors untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Präparation des primären, cytostatisch aktiven Metaboliten des Cyclophosphamid ("M-cyclophosphamid")

Cyclophosphamid [R] wird im Hydroxylasesystem nach Udenfriend [41] (O_2 / Fe^{2+} / Ascorbinsäure) oxydiert, nicht umgesetztes Cyclophosphamid sowie entstandenes Bis - (ß-chloräthyl) - amin (Nor - N-LOST) durch Extraktion mit Di-Chlormethan entfernt und die verbleibende wässrige Phase erschöpfend mit Butan-2-ol extrahiert. Anschließend wurde der Butan-2-ol-Auszug auf einer Sephadex-LH-20-Säule mit Butan-2-ol als Laufmittel getrennt. Identifizierung der Fraktionen mit dem γ -Nitrobenzylpyridintest nach Friedmann und Boger [18] und papierchromatographisch auf Schleicher und Schüll 2043 b bei 4° C absteigend mit n-Butanol/Eisessig/Wasser (6:2:2) als Laufmittel; Identifizierung mit γ -Nitrobenzylpyridin / Acetonspray [26, 40]. Die ersten NBß-positiven Fraktionen des Säuleneluats, welche im Papierchromatogramm einen R_f-Wert von 0.88 enthalten, wurden gesammelt und eingeengt. Sie enthalten die cytostatisch wirksame Metabolitfraktion des Cyclophosphamids; ihre cytostatische Aktivität gegenüber isolierten Yoshida-Ascites-Zellen der Ratte im Transplantationstest nach Schmähl und Druckrey [39] betrug 40 cytostatische Einheiten pro μMol Alkylans.

2.2 Ehrlich-Ascites-Tumorzellen

Die Ehrlich-Ascites-Tumorzellen, an denen die Untersuchungen durchgeführt wurden, wurde 1963 von SCHACHTSCHABEL [36, 37] aus der Ascitesflüssigkeit einer Maus isoliert, in Zellkultur überführt und seitdem ununterbrochen in vitro weitergezüchtet. Es wurden bisher über 400 Subkultivierungen vorgenommen.

R Endoxan, Asta-Werke, Brackwede / Bielefeld

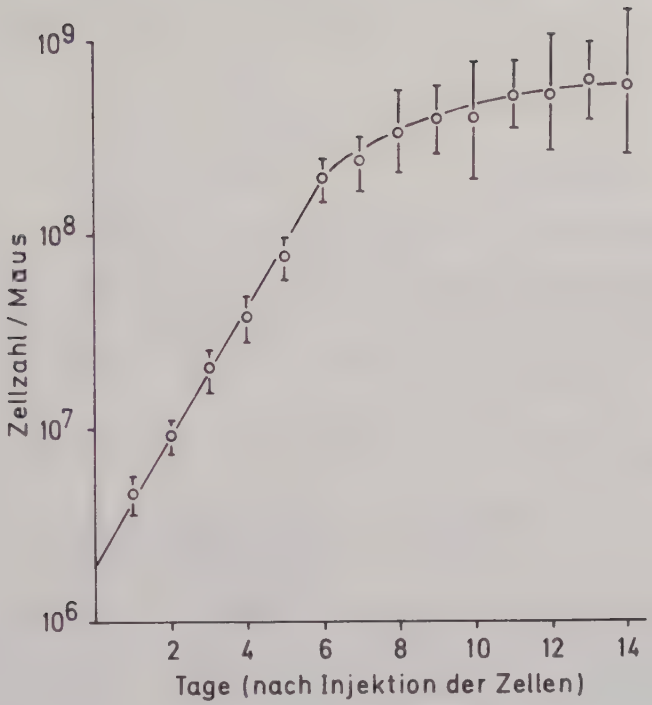


Abb. 2: Vermehrung von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen nach intraperitonealer Injektion in NMRI - Mäuse (männlich, 30 - 35 g). 2 x 10^6 Zellen/Maus, suspendiert in 0. 5 ml Earle' s Salzlösung. Mittlere Überlebenszeit: 25. 22 $\pm$ 4. 40 Tage, N = 49.

Die Tumorpathogenität der Zellen bei Mäusen wurde ständig überprüft. Nach intraperitonealer Injektion kommt es zur Ausbildung von Ascites-Tumoren, an denen die Mäuse ca. 24 - 28 Tage nach der Injektion sterben. Abbildung 2 zeigt die Vermehrung der Zellen in vivo.

Die Zellen haben vorwiegend einen hyperdiploiden Chromosomensatz mit 43 - 45 Chromosomen pro Metaphase [3]. Neben den für

die Maus typischen telozentrischen Chromosomen werden in jeder Metaphase charakteristische "Marker"-Chromosomen (im allgemeinen zwei metazentrische Chromosomen und ein Chromosom mit sekundärer Konstriktion) gefunden [32].

2.3 Kulturmedium

Als Kulturmedium diente Eagle's Basal Medium, das mit fötalem Kalbsserum ergänzt wurde. Zur Herstellung des Mediums wurde ein Trockenpulver (Grand Island Biological Company), das mit Ausnahme von $NaHCO_3$ alle Bestandteile des Basal Mediums (s. Tab. 1) enthält, verwendet.

Bestandteil	mg/l	Bestandteil	mg/l
NaCl	6800,0	L-Methionin	7,50
KCl	400,0	L-Phenylalanin	16,50
$NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$	140,0	L-Threonin	24,0
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200,0	L-Tryptophan	4,0
$CaCl_2$ (anhyd.)	200,0	L-Valin	23,50
$NaHCO_3$	2200,0	Biotin	1,0
Glukose	1000,0	Folsäure	1,0
L-Glutamin	292,0	Cholin	1,0
L-Arginin HCl	21,0	Nicotinsäureamid	1,0
L-Cystein	12,0	D-Ca-Pantothensäure	1,0
L-Tyrosin	18,0	Pyridoxal HCl	1,0
L-Histidin	8,0	Thiamin HCl	1,0
L-Isoleucin	26,0	Riboflavin	0,10
L-Leucin	26,0	meso-Inosit	1,80
L-Lysin	26,0	Phenolrot	10,0

Tab. 1 Basal Medium (Eagle) mit Earle's Salzen

Nach dem Lösen des Trockenpulvers in aqua bidest. wurden pro Liter noch folgende Substanzmengen zugesetzt:

a) 2.2 g $NaHCO_3$
b) 5.0 ml 1 N HCl
c) 100 000 IE Penicillin-G-Natrium
d) 100 mg Streptomycin
entsprechend 125 mg Streptomycin - Sulfat

Nach Sterilfiltration dieses Mediums durch Membranfilter (Porengröße 0.2 µm) wurden pro Liter 100 ml fötales Kalbsserum (Grand Island Biological Company), das bereits steril bezogen wurde, zugesetzt.

2.4 Züchtung von Ehrlich - Ascites - Tumorzellen in Kultur, Wachstumsverhalten

Die Zellen werden in flachen, glattwandigen Flaschen mit einem Fassungsvermögen von 60 oder 120 ml gezüchtet. Dabei wachsen die Zellen an dem von Medium bedeckten Teil der Innenwand der Flaschen in Form eines Zellrasens ("Monolayer"-Kultur"). Die Zellen werden bei 37°C in einem Inkubator gehalten. Im allgemeinen wird das Medium alle 24 oder 48 Stunden erneuert. Der Mediumwechsel erfolgt - wie alle Manipulationen an Kulturen - unter sterilen Bedingungen. Dazu wird das verbrauchte Medium dekantiert, anschließend werden pro Kultur 10 bis 15 ml frisches, vorgewärmtes (37°C) Medium durch Einpipettieren zugefügt. Danach werden die Kulturen mit einem Gasgemisch von 7% CO_2, 20 % O_2 und 73 % N_2 begast.

Zur Durchführung eines Experimentes wird ein Kollektiv von Kulturen gleicher Zellzahl benötigt. Dazu werden die Kulturen durch Einpipettieren ("Einsaat") gleiche Anteile einer Zell-

suspension hergestellt. Die Zellsuspension wird durch mechanisches Ablösen ("Gummiwischer") des Zellrasens von der Glasfläche gewonnen.

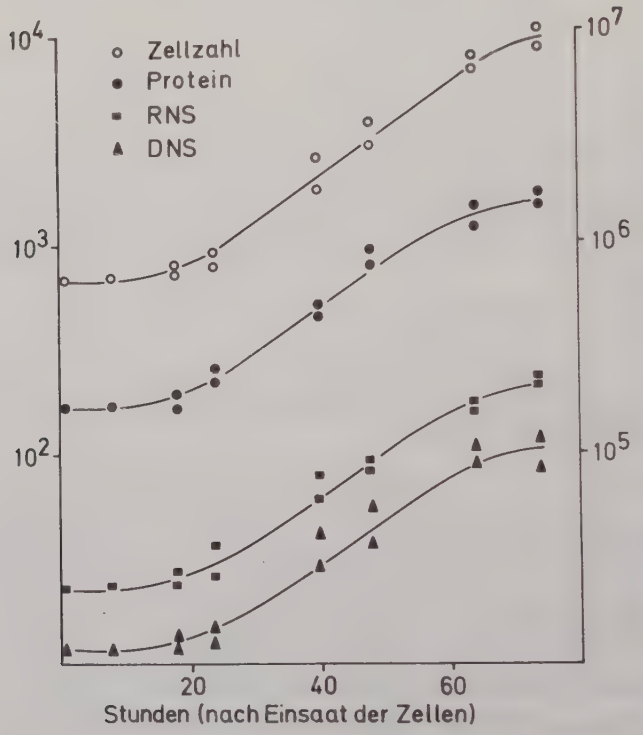


Abb. 3: Vermehrung von Zellzahl, DNS-, RNS- und Proteingehalt in Monolayer-Kulturen des Ehrlich-Ascites-Tumors. Kulturbedingungen siehe 2. 4.

Die Zellen sedimentieren auf die Flaschenwand und haften nach etwa 30 Minuten fest an dem Glas. Nach einer durch die Manipulation der Subkultivierung bedingten Verzögerungsphase von 10 bis 20 Stunden vermehrt sich die Population mit einer durchschnittlichen Verdoppelungszeit von etwa 16 bis 18 Stunden ("expotentielle Wachstumsphase"). Sobald nach fortschreitender Zellvermehrung die gesamte

Glasfläche mit Zellen bedeckt ist, wobei diese sich auch an manchen Stellen übereinander lagern, kommt es zu einer Verminderung der Teilungsgeschwindigkeit, und die Zahl der am Glas haftenden erreicht allmählich einen nahezu konstanten Maximalwert ("stationäre Wachstumsphase"). Bei weiterer Kultivation können sich dann Zellen oder Zellhaufen vom Glas ablösen.

2.5 Inkubationsexperimente an Zellkulturen mit Nor-N-LOST, Stickstoff-LOST und M-cyclophosphamid

Die Experimente wurden an expotentiell sich vermehrenden Kulturen durchgeführt. Die zu testenden Substanzen wurden den Kulturen (10 ml Nährmedium, ca. 1×10^6 Zellen/Kultur) etwa 48 Stunden nach Einsaat der Zellen zugesetzt. Alle Manipulationen an Kulturen (Mediumwechsel, Zusatz von Substanzen) werden in einem Inkubationsraum bei 37° C durchgeführt. Die Substanzen wurden in aqua bidest. gelöst und anschließend durch Sterilfiltration keimfrei gemacht (Sterilfiltrationsvorsätze für Rekordspritzen, Porengröße 0.2 μm).

Die frisch hergestellten, sterilen Substanz-Lösungen wurden den Kulturen etwa 2 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel zugesetzt, wobei die Konzentrationen der gelösten Substanzen so gewählt wurde, daß jeweils ein Zusatz von 0.1 ml pro Kultur (10 ml Nährmedium) erforderlich war. Die Kontrollkulturen erhielten entsprechend einen Zusatz von 0.1 ml aqua bidest.

2.6 Bestimmung von Zellzahl und Trypanblau - Färbbarkeit

Nach mechanischem Ablösen des Zellrasens mit einem Gummiwischer in einer bekannten Menge Medium oder Earle's Salz - lösung wurde die Anzahl der Zellen pro ml Suspension in einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt und auf das Gesamtvolumen der Suspension umgerechnet. Eine Verdünnung oder Kon-

zentrierung der Suspension war manchmal notwendig, um eine genügende Anzahl von Zellen auszählen zu können (300 - 500 Zellen/ 0.5 mm^2). "Abgestorbene" und membrangeschädigte Zellen lassen sich im Gegensatz zu lebensfähigen Zellen mit dem Farbstoff Trypanblau anfärben [15]. Die Anfärbbarkeit beruht wahrscheinlich darauf, daß die Zellmembran nicht mehr intakt ist [15]. Zur Bestimmung des Anteils der Trypanblau-färbbaren Zellen wird eine Zellsuspension (0.8 ml) mit 0.2 ml der Farbstofflösung (0.4 % Trypanblau in Earle's Salz) gemischt und die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Der Anteil der "toten" Zellen betrug zwischen 0.5 und 5 % in Kontrollkulturen.

2.7 Bestimmung des Einbaus von ^{14}C-Leucin, ^{14}C-Thymidin und ^{14}C-Uridin

Die Synthese von Protein, DNS und RNS wurde durch die Messung des Einbaus von radioaktivem Leucin, Thymidin und Uridin in die Zelle verfolgt. Die radioaktiven Substanzen waren in Eagle's Basal Medium gelöst. Pro Kultur (10 ml Medium) wurden 0.2 ml Lösung zugegeben, die im einzelnen folgenden Radioaktivitäts - bzw. Substanzmengen entsprachen:

^{14}C-L-Leucin-1 : 0.1 µCi (260 µg in 10 ml Medium vorhanden)
^{14}C-Thymidin-2 : 0.2 µCi entsprechend 13 µg Thymidin
^{14}C-Uridin-2 : 0.1 µCi entsprechend 24 µg Uridin

Nach der Inkubation wurden die Kulturen folgendermaßen gewaschen, fixiert und aufgearbeitet:

Dekantieren des Mediums,
Waschen der Zellen mit 10 ml eiskalter Earle's Salzlösung(2x2 min), Behandlung mit 10 ml eiskalter 0.25 M Perchlorsäure (2 x 5 min), Entwässerung und Lipidextraktion mit jeweils 10 ml eiskaltem, absoluten Äthanol (2 x 5 min), einem Gemisch (V/V = 1/1) von 96 %

Äthanol und Diäthyläther (2 x 5 min), Äther (1 x 5 min), Austrocknen der Flaschen bei Raumtemperatur.

Die getrockneten Zellrückstände wurden in 1.6 ml 1 N NaOH gelöst. 0.4 ml dieser Lösung wurden mit 10.0 ml Szintillationsflüssigkeit nach BRAY [4] versetzt und die Menge der eingebauten Radioaktivität mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt. Jede Probe wurde mindestens zweimal zwanzig Minuten gezählt. Der Quenchfaktor wurde mit 1.21 bestimmt.

2.8 Bestimmung des Proteingehaltes von Zellkulturen

Die Proteinbestimmung an den gewaschenen, fixierten und in NaOH gelösten (s. 2.7) Kulturen wurde nach LOWRY et al. [31] in der Modifikation nach OYAMA und EAGLE [34] durchgeführt. Als Referenzsubstanz diente Rinderalbumin. Die Extinktion bei 660 nm wurde exakt 10 Minuten nach Zugabe des Folin-Reagenzes gemessen. Unter diesen Bedingungen ergab sich eine lineare Abhängigkeit zwischen Extinktion und Proteinkonzentration bis 150 µg/Ansatz.

2.9 Bestimmung des DNS- und RNS-Gehaltes von Zellkulturen

2.9.1 Aufarbeitung der Kulturen und Hydrolyse

Zum Waschen, Fixieren und zur Lipidextraktion wurde die Kulturen nach folgendem Schema aufgearbeitet:

Dekantieren des Mediums

Waschen und Behandlung mit 10 ml Volumina folgender Lösungen:

Earle's Salzlösung	(eiskalt, 2 x 2 min)
0.25 N $HCLO_4$	(eiskalt, 2 x 5 min)
Äthanol	(eiskalt, 2 x 5 min)
Äthanol-Äther (C/V = 1 + 1)	(eiskalt, 2 x 5 min)
Äther	(eiskalt, 1 x 5 min)

Die fixierten und getrockneten Zellrückstände wurden anschließend in ca. 3 ml eiskalter 0.5 N $HCLO_4$ mit einem Gummiwischer abgelöst. Nach Zentrifugation wurde das Sediment zweimal 20 Minuten in je 1 ml 0.5 N $HCLO_4$ bei 80°C hydrolysiert. Die beiden Hydrolysate wurden abzentrifugiert und die Überstände vereinigt. Die Proteinbestimmung (nach 2.8) des Sediments ergab, daß ca. 30% Verlust nach der Hydrolyse eingetreten war.

2.9.2 DNS-Bestimmung

Die DNS-Bestimmung im Hydrolysat wurde nach BURTON [9] ausgeführt. 0.5 ml Hydrolysat wurden mit 1.0 ml Diphenylaminreagenz für 20 Stunden bei 30°C inkubiert und die Extinktion bei 600 nm gemessen. Das Diphenylaminreagenz wurde folgendermaßen hergestellt: 1.5 g Diphenylamin wurden in 100 ml Eisessig unter Zugabe von 1.5 ml konz. H_2SO_4 gelöst. Unmittelbar vor Zugabe wurde dem Reagenz 0.35 M Acetaldehyd (0.1 ml Acetaldehyd/20 ml Reagenz) zugesetzt.

Als Referenzsubstanz diente 2'-Desoxyadenosin oder Desoxyadenylsäure. Zur Umrechnung auf DNS wurde mit dem Faktor 2.482 (2'-Desoxyadenosin) bzw. 1.883 (Desoxyadenylsäure) multipliziert.

2.9.3 RNS-Bestimmung

Die RNS-Bestimmung wurde nach CERIOTTI [11] ausgeführt. 1.0 ml Hydrolysat wurden mit 1.0 ml Orcinol-Reagenz versetzt und 40 Minuten im siedenden Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlung mit kaltem Wasser wurde innerhalb von 30 Minuten die Extinktion bei 675 nm gemessen. Als Referenzsubstanz diente Adenosin oder 5'-Adenylsäure. Zur Umrechnung auf RNS wurde mit dem Faktor 2.405 (Adenosin) bzw. 1.852 (5'-Adenylsäure) multipliziert.

2.10 Reagenzien und Geräte

Eagle's Basal Medium (Trockenpulver)	(Grand Island Biological Company, New York)
Fötales Kalbsserum	(Grand Island Biological Company, New York)

Earle's Salzlösung ohne Glukose [14]:

$NaH_2PO_4 \times H_2O$	0.125 g
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0.200 g
$NaHCO_3$ (Riedel de Haen)	2.200 g
$CaCl_2$	0.200 g
NaCl	6.800 g
KCl	0.400 g
Aqua bidest. ad	1000.00 ml

Penicillin-G-Natrium	(Hoechst)
Streptomycin (als Streptomycinsulfat)	(Bayer)
Nor-N-LOST: Bis-(ß-chloräthyl)-amin	(Schuchardt)
Stickstoff-LOST, HN_2: N-methyl-(bis-ß-chloräthyl)-amin	(Schuchardt)

M-cyclophosphamid wurde von Herrn Prof. Dr. Dr. Hohorst zur Verfügung gestellt (s. 2.1).

L-Leucin-1-^{14}C	(Amersham)
Thymidin-2-^{14}C	(Amersham)
Uridin-2-^{14}C	(Amersham)
Trypanblau-Lösung (0.4 proz. in Hank's Salzlösung)	(Grand Island Biological Company, New York)
Mischgas (7% CO_2, 20 % O_2, Rest N_2)	(Messer Griesheim)
Rinder-Albumin	(Sigma)

Bray-Liquid-Szintillator [4]:

Äthylenglykol (Riedel de Haen)	20.00 ml
Naphthalin	60.000 g
Methanol	100.00 ml
Dimethyl-POPOP (Packard)	0.200 g
PPO (Packard)	4.000 g
Dioxan ad	1000.00 ml

Alle anderen Reagenzien und Chemikalien, die nicht aufgeführt sind, bzw. deren Herkunft nicht angegeben ist, wurden als p. A. -Substanz von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

Zeiss Spektralphotometer PM 4

Sartorius Sterilfiltrationsanlage SM 162 28 mit Membranfilter (Porengröße 0.2 μm)

Beckman Flüssigkeits-Szintillationszähler LS 100

Packard Flüssigkeits-Szintillationszähler, Modell 574

2-ounce und 4-ounce, Arzneiflaschen als Kulturgefäße (Brockway Glass Co., New York)

3. Ergebnisse

3.1 Dosis-Wirkungskurven

Zur Untersuchung der Dosisabhängigkeit der Wirkung von Nor-N-LOST, Stickstoff - LOST und M-cyclophosphamid auf expotentiell sich vermehrende Ehrlich-Ascites-Zellkulturen wurden die Substanzen dem Nährmedium in verschiedenen Konzentrationen für die Dauer von 20 Stunden zugesetzt. Diese Inkubationszeit wurde deshalb gewählt, um mindestens eine durchschnittliche Generationszeit der Zellen (16 bis 18 Stunden) zu erfassen. Als Parameter der Wirkung wurden Proteingehalt, Proteinsynthese (gemessen am Leucin-Einbau) und DNS-Synthese (gemessen am Thymidin-Einbau) von behandelten und Kontrollkulturen gemessen.

In den Tabellen 2 a - c sind diese Ergebnisse tabellarisch und in den Abbildungen 4 a - c in Form von Dosis-Wirkungskurven dargestellt.

Tab. 2: Einfluß verschiedener Konzentrationen von Nor-N-LOST (a), Stickstoff-LOST (b) und M-cyclophosphamid (c) auf den Proteingehalt, den Einbau von ^{14}C-Thymidin in die DNS und von ^{14}C-Leucin in das Protein expotentiell sich vermehrender Ehrlich-Ascites-Zellkulturen. Mediumvolumen/Kultur: 10 ml.
Mittelwerte $\pm$ Abweichung der Meßergebnisse von zwei Kulturen. In Klammern : Relativwerte (Kontrolle = 100 %).

Nor - N - LOST (µg/ml)	Protein / Kultur (µg)	^{14}C-Thymidin-Einbau (I pm/mg Protein)
0	1 252 (100 %) ± 36	41 365 (100 %) ±2 205
1.0	1 247 (99.6) ± 12	33 190 (80.2) ±1 001
10.0	1 208 (96.5) ± 80	21 479 (51.9) ± 364
100.0	872 (69.6) ± 80	10 703 (25.9) ± 395
500.0	72 (5.7) ± 8	239 (0.6) ± 24

Tab. 2a: Nor-N-LOST. (Inkubationszeit: 20 h. Proteingehalt am Beginn der Inkubation: 547 µg/Kultur)

Stickstoff-LOST (µg/ml)	Protein/Kultur (µg)		Einbau (Ipm/mg Protein) ^{14}C-Leucin		^{14}C-Thymidin	
0	660 ±55	(100)	7 454 ± 162	(100)	25 510 ±2 331	(100)
0.08	556 ±27	(84.2)	7 433 ± 144	(99.7)	10 432 ± 804	(40.9)
0.40	352 ±19	(53.3)	6 085 ± 346	(81.6)	8 767 ± 363	(34.4)
2.00	62 ±18	(9.4)	1 440 ± 297	(19.3)	752 ± 34	(2.9)
10.00	0	(0)	0	(0)	292 ± 47	(1.1)

Tab. 2 b: Stickstoff - LOST. (Inkubationszeit: 20 h. Proteingehalt am Beginn der Inkubation: 270 µg/Kultur)

M-cyclophosphamid (µg/ml)	Protein/Kultur (µg)		Einbau (Ipm/mg Protein) ^{14}C-Leucin		^{14}C-Thymidin	
0	759 ±45	(100)	10 706 ± 897	(100)	39 880 ±1 799	(100)
0.032	731 ±27	(96.3)	10 177 ± 401	(95.1)	34 530 ±2 194	(86.6)
0.32	706 ±24	(93.0)	10 857 ± 256	(101)	23 340 ± 383	(58.5)
3.20	385 ±48	(50.7)	7 650 ± 70	(71.5)	14 551 ±1 810	(36.5)
16.00	131 ±14	(17.3)	412 ± 65	(3.9)	765 ± 13	(1.9)

Tab. 2 c: M-cyclophosphamid. (Inkubationszeit: 21 h. Proteingehalt am Beginn der Inkubation: 295 µg/ Kultur)

Wie die Abbildungen 4 a - c zeigen, wirken die drei Substanzen in sehr unterschiedlichen Konzentrationsbereichen. Während eine nahezu vollständige Hemmung des Thymidin-Einbaus und ein Absinken des Proteingehaltes (unter den Ausgangswert bei Beginn der Inkubation) durch Nor-N-LOST erst bei einer Konzentration zwischen 100 und 1000 µg/ml Medium eintrat, zeigten sich gleiche Effekte bei Stickstoff - LOST schon zwischen 1 und 10 und bei M-cyclophosphamid zwischen 10 und 100 µg/ml Medium. Zwischen diesem Konzentrationsbereich völliger Hemmung des Einbaus von Leucin- und Thymidin und der Konzentration, bei der sich erste Anzeichen einer Wirkung auf den Thymidin-Einbau zeigten, liegen bei allen drei Substanzen etwa zwei Zehnerpotenzen.

Große Unterschiede bestehen jedoch hinsichtlich der Konzentrationen, bei denen der Wirkungseintritt auf Proteingehalt und Leucin-Einbau einerseits und Thymidin-Einbau andererseits erfolgt (Abb. 4 a - c); für alle drei Substanzen gilt, daß bei Konzentrationen, in denen Protein gehalt und -synthese noch nicht beeinträchtigt sind, schon eine starke Hemmwirkung auf den DNS-Synthese eingetreten ist. Das gilt besonders für Stickstoff-LOST.

Der Verlauf der Dosis-Wirkungskurven der drei Substanzen ist sehr ähnlich, jedoch liegen sie in verschiedenen Konzentrationsbereichen. Dabei hat Stickstoff-LOST die größte, M-cyclophosphamid die geringste Hemmwirkung.

Die Konzentrationen, bei denen 50proz. Hemmwirkungen (ED_{50}) eintreten, liegen im Falle des Thymidin-Einbaus für Nor-N-LOST bei etwa 10µg/ml, für Stickstoff-LOST bei etwa 0. 04 µg/ml und für M-cyclophosphamid bei etwa 0. 9 µg/ml Medium. Auffällig ist jedoch, daß eine 50 proz. Hemmung der Proteinsynthese erst bei etwa 10-fach höheren Konzentrationen auftrat (Abb. 4 a - c).

Abb. 4: Einfluß der Konzentrationen von Nor-N-LOST (a), Stickstoff-LOST (b) und M-cyclophosphamid (c) im Medium auf den Proteingehalt, den Einbau von ^{14}C-Leucin in das Protein und den Einbau von ^{14}C-Thymidin in die DNS expotentiell wachsender Ehrlich-Ascites-Zellkulturen. Inkubationsdauer: 20 h. Mediumvolumen / Kultur : 10 ml. Relative Werte (Prozent), Kontrolle = 100 %. Mittelwerte ± Abweichung der Meßergebnisse von zwei Kulturen.

- O Proteingehalt (µg / Kultur),
- ■ ^{14}C-Leucin-Einbau (Ipm / mg Protein),
- X ^{14}C-Thymidin-Einbau (Ipm / mg Protein).

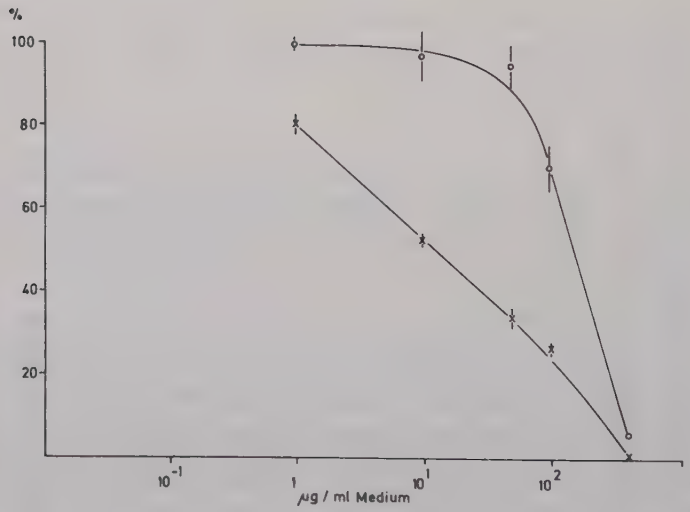


Abb. 4 a: Nor-N-LOST

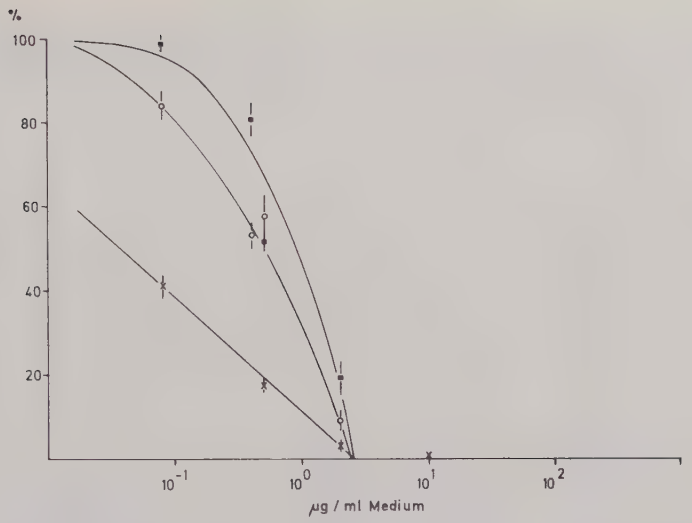


Abb. 4 b: Stickstoff-LOST

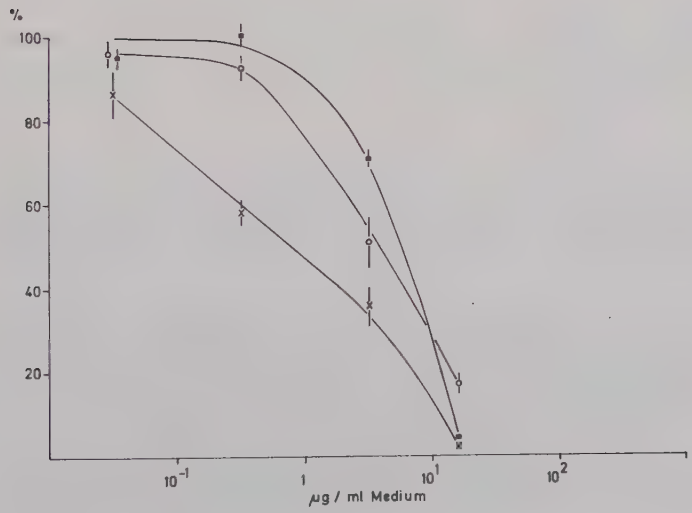


Abb. 4 c: M-cyclophosphamid

3.2 Proteingehalt und Zellzahl der Kulturen, zellulärer Proteingehalt

In Tabelle 3 ist die Wirkung von Nor-N-LOST, Stickstoff - LOST und M-cyclophosphamid auf den Proteingehalt der Kulturen und auf den durchschnittlichen zellulären Proteingehalt nach einer Inkubationszeit von 20 bzw. 40 Stunden dargestellt. In diesen Experimenten wurden solche Konzentrationen der Substanzen gewählt, die im Bereich von 50 proz. Hemmung der Proteinsynthese lagen ("ED_{50}").

Während in Gegenwart von Stickstoff - LOST die Zellzahl bereits nach 20 Stunden unter dem Ausgangswert lag, und nach 40 Stunden noch weiter abgenommen hatte, wurde bei Nor - N- LOST nach einem anfänglichen geringen Anstieg eine Abnahme der Zellzahl erst nach 40 Stunden festgestellt (Tab. 3). M-cyclophosphamid hemmt zwar auch - im Vergleich zu den Kontrollen - während der ersten 20 Stunden die Zellvermehrung, in der Folgezeit blieb die Zellzahl jedoch konstant. In Abbildung 5 sind die Veränderungen von Zellzahl und Proteingehalt der Kulturen unter der Einwirkung der drei Substanzen dargestellt.

Es fällt auf, daß sich der Proteingehalt der Zellen (μg Protein/10^6 Zellen) nach 20 und 40 Stunden Inkubationszeit bei allen drei Substanzen in ähnlicher Weise verändert hatte (Tab. 3): die Zellen akkumulierten mit zunehmender Inkubationszeit Protein und zwar auf mehr als das Doppelte des Proteingehaltes der Kontrollen von ca. 210 μg/ 10^6 Zellen. Bei der mikroskopischen Betrachtung fiel auch eine entsprechende Größenzunahme auf. Der Proteingehalt der Kontrollzellen nach 40 Stunden Inkubationszeit darf hier nicht als Vergleichswert herangezogen werden, da der zelluläre Proteingehalt

	Inkubationszeit (h)	Kontrolle	Nor - N-LOST (50µg/ml)	Stickstoff-LOST (0.5µg/ml)	M-cyclophosphamid (2.0µg/ml)
Zellzahl/Kultur (10^6)	0	2.80	2.80	2.80	2.80
	20	7.63	3.64	2.12	4.02
	40	20.40	1.70	0.22	4.19
Protein/Kultur (µg)	0	584 ± 7	584 ± 7	584 ± 7	584 ± 7
	20	1 608 ±23	1 296 ±15	680 ± 8	1 336 ±18
	40	2 800 ±12	792 ± 9	96 ± 2	1 992 ±12
Protein/10^6 Zellen (µg)	0	208.57 ±2.5	208.57 ±2.5	208.57 ±2.5	208.57 ±2.5
	20	210.69 ±3.0	356.43 ±4.1	320.15 ±3.8	332.34 ±4.5
	40	137.25 ±1.0	464.79 ±5.3	436.36 ±9.1	475.64 ±2.9

Tab. 3: Einfluß von Nor-N-LOST, Stickstoff-LOST und M-cyclophosphamid auf die Zellzahl, den Proteingehalt/Kultur und den zellulären Proteingehalt exponentiell wachsender Ehrlich-Ascites-Zellkulturen. Inkubationsdauer: 20 und 40 Stunden. Mediumvolumen/Kultur: 10.0 ml. Mittelwerte ± Abweichung der Proteinbestimmungen an zwei Kulturen, Zellzahlbestimmung an einer Kultur.

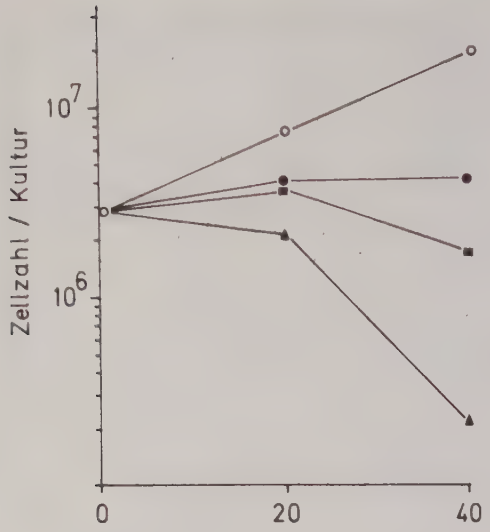


Abb. 5 a

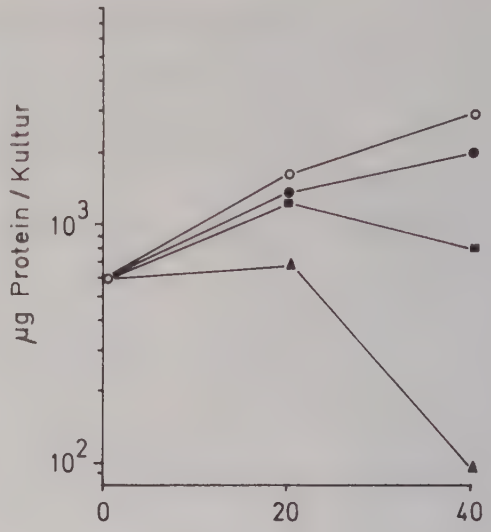


Abb. 5 b

Abb. 5 : Zellzahl (a) und Proteingehalt (b) expotentiell sich vermehrender Ehrlich-Ascites-Zellkulturen nach Inkubation mit Nor-N-LOST (50 µg / ml), Stickstoff-LOST (0,5 µg / ml) und M-cyclophosphamid (2,0 µg / ml). Mediumvolumen : 10 ml / Kultur. Abszisse : Inkubationszeit (Stunden). Abweichungen s. Tab. 3. ○ Kontrollen , ● M-cyclophosphamid, ■ Nor-N-LOST, ▲ Stickstoff-LOST.

von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen bei großer Zelldichte (ca. 20 x 10^6 Zellen/Kultur) vermindert ist, wie andere Experimente gezeigt haben (siehe auch Abb. 3).

3.3 Trypanblau-Färbbarkeit

Die Bestimmung des Anteils der mit Trypanblau anfärbbaren "toten" Zellen bestätigt die durch die Zellzahlbestimmung erhaltenen Befunde über die Toxizität der getesteten Substanzen, wenn man Abnahme der Zellzahl und Zunahme der Trypanblau-färrbaren Zellen als Zeichen einer toxischen Schädigung wertet.

	Inkubationszeit (h)	Kontrollen	Nor-N-LOST (50µg/ml)	Stickstoff-LOST (0.5µg/ml)	M-cyclophosphamid (2.0µg/ml)
Trypanblau gefärbte Zellen (%)	0	1.78	1.78	1.78	1.78
	20	1.60	1.65	7.91	4.18
	40	0.86	21.12	68.20	4.87

Tab. 4: Einfluß von M-cyclophosphamid, Nor-N-LOST und Stickstoff-LOST auf den Anteil der Trypanblaufärbbaren("toten")Zellen inexpotentiell wachsenden Ehrlich-Ascites-Zellkulturen. Gesamtzellzahl/ Kultur = 100 %. Auszählung von mindestens 500 Zellen aus jeder Kultur.

Der Anteil der Trypanblau-färbbaren Zellen nach Inkubation mit M-cyclophosphamid (2.0 µg/ml) liegt mit 4.8 % nach 40 Stunden noch an der oberen Grenze des Normbereiches. Bei Stickstoff - LOST (0.5 µg/ml) kommt es mit der Abnahme der Zellzahl bei ansteigender Inkubationszeit zu einem starken Anstieg der Trypanblau-Färbbarkeit der noch vorhandenen Zellen (68 % nach 40 Stunden), sozusagen als Ausdruck der Zelldegeneration. Der anfängliche Anstieg der Zellzahl mit nachfolgendem Verlust von Zellen ("Absterben") in Gegenwart von Nor-N-LOST (50 µg/ml) spiegelte sich ebenfalls in einem Anstieg der Trypanblau-Färbbarkeit wieder (Tab. 4).

3.4 DNS- und RNS - Gehalt der Kulturen

In weiteren Experimenten sollte untersucht werden, ob der DNS- und RNS-Gehalt der Kulturen unter der Einwirkung der drei Substanzen in ähnlicher Weise beeinflußt wird. wie der Vermehrung der Zellzahl bzw. der Einbau von Thymidin und Uridin (3.1 u. 3.6). Dabei wurden die gleichen Konzentrationen und Inkubationszeiten wie bei der Bestimmung von Zellzahl und zellulärem Proteingehalt (3.2) gewählt.

Wie Tabelle 5 und Abbildung 6 zeigen, kommt es unter der Einwirkung von Stickstoff-LOST zu einem raschen Abfall des DNS-Gehaltes der Kultur. M-cyclophosphamid bewirkte in den ersten 20 Stunden eine Hemmung der DNS-Zunahme, danach blieb der DNS-Gehalt konstant. Der RNS-Gehalt wird durch M-cyclophosphamid nach 20 Stunden Inkubation nicht beeinflußt, bleibt danach jedoch auf diesem Niveau. Hinsichtlich der Wirkung auf DNS- und RNS-Gehalt nimmt Nor-N-LOST wieder eine Mittelstellung zwischen Stickstoff-LOST und M-cyclophosphamid ein. Dabei fällt die weitgehende Übereinstimmung zwischen den Veränderungen von Zellzahl und DNS-Gehalt einerseits (vergl. Abb. 5 mit Abb. 6) bzw. RNS- und Proteingehalt der Kulturen andererseits auf.

	Inkubationszeit (h)	Kontrollen	Nor-N-LOST (50µg/ml)	Stickstoff-LOST (0.5µg/ml)	M-cyclophosphamid (2.0µg/ml)
DNS/Kultur (µg)	0	26.37 ± 0.21	26.37 ± 0.21	26.37 ± 0.21	26.37 ± 0.21
	20	70.96 ± 4.68	37.34 ± 1.76	15.25 ± 1.46	44.18 ± 4.00
	40	133.48 ± 2.67	25.68 ± 0.31	4.40 ± 0.07	47.44 ± 0.62
RNS/Kultur (µg)	0	48.73 ± 2.86	48.73 ± 2.86	48.73 ± 2.86	48.73 ± 2.86
	20	133.68 ± 0.83	103.59 ± 1.35	78.62 ±13.21	132.76 ± 9.12
	40	268.10 ±11.80	81.66 ± 0.49	20.28 ± 1.42	127.68 ± 0.89

Tab. 5: Einfluß von Nor-N-LOST, Stickstoff-LOST und M-cyclophosphamid auf den DNS- und RNS-Gehalt expotentiell wachsender Ehrlich-Ascites-Zellkulturen. Mediumvolumen/Kultur: 10.0 ml. Mittelwerte ± Abweichung der Meßergebnisse von zwei Kulturen.

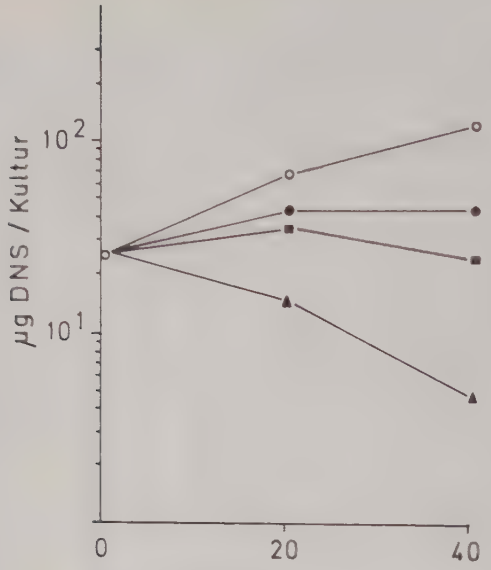


Abb. 6 a

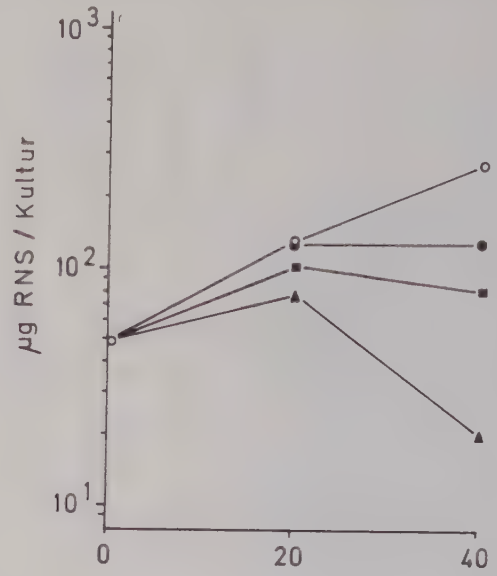


Abb. 6 b

Abb. 6 : DNS-Gehalt (a) und RNS-Gehalt (b) expotentiell sich vermehrender Ehrlich-Ascites-Zellkulturen nach Inkubation mit Nor-N-LOST (50 µg / ml), Stickstoff-LOST (0,5 µg / ml) und M-cyclophosphamid (2,0 µg / ml). Mediumvolumen : 10 ml / Kultur. Abszisse : Inkubationszeit (Stunden). Abweichungen s. Tab. 5. ○ Kontrollen, ● M-cyclophosphamid, ■ Nor-N-LOST, ▲ Stickstoff-LOST.

3.5 Protein/DNS- und RNS/DNS-Quotienten

Aufgrund quantitativer Bestimmungen von DNS-, RNS- und Proteingehalt an denselben Kulturen können diese Parameter in Beziehung gesetzt werden; dadurch wird eine Aussage über Veränderungen des Verhältnisses dieser Makromoleküle in der Kultur bzw. in der Zelle ermöglicht. Die Protein/DNS- und RNS/DNS-Quotienten steigen unter den gewählten Versuchsbedingungen bei allen drei Substanzen an (Tab. 6), wobei der größte Anstieg durch Stickstoff-LOST verursacht wird. Nor-N-LOST und M-cyclophosphamid haben fast gleiche Effekte. Bezogen auf DNS kam es unter der Einwirkung aller drei Substanzen zu einem Anstieg von Protein und RNS.

	Kontrollen	Nor-N-LOST (50µg/ml)	Stickstoff-LOST (0.5µg/ml)	M-cyclophosphamid (2.0µg/ml)
$\frac{\text{Protein}}{\text{DNS}}$	22.66	34.71	44.59	30.24
$\frac{\text{RNS}}{\text{DNS}}$	1.88	2.77	5.15	3.00

Tab. 6: Einfluß von Nor-N-LOST, Stickstoff-LOST und M-cyclophosphamid auf den zellulären Protein/DNS- und RNS/DNS-Quotienten wachsender Ehrlich-Ascites-Zellkulturen. Mediumvolumen/Kultur: 10.0ml. Inkubationsdauer: 20 Stunden.

3.6 Pulsmarkierung der Kulturen mit ^{14}C-Leucin, ^{14}C-Thymidin und ^{14}C-Uridin

Während in den bisherigen Experimenten Resultate über Veränderungen im Gehalt bzw. der Synthese von DNS, RNS und Protein nach Einwirkung der Substanzen für 20 oder 40 Stunden ermittelt wurde, sollte durch Pulsmessungen des Einbaus von ^{14}C-markiertem Leucin, Thymidin und Uridin analysiert werden, innerhalb welcher Intervalle einer zwanzigstündigen Inkubationszeit es zu diesen Veränderungen kommt, und ob Unterschiede im Eintritt und Verlauf der Hemmwirkungen auf DNS-, RNS- und Proteinsyntheseraten bestehen. Tabelle 7 a - c zeigt die Ergebnisse, die Verlaufskurven sind in Abb. 7 a - c dargestellt.

Tab. 7: Einfluß von Nor-N-LOST, Stickstoff-LOST und M-cyclophosphamid auf den Einbau von ^{14}C-markiertem Thymidin, Uridin und Leucin in Ehrlich-Ascites-Zellkulturen während verschiedener Intervalle einer zwanzigstündigen Inkubation (Pulsmarkierung).
Mediumvolumen/Kultur : 10 ml.
Mittelwerte $\pm$ Abweichung der Meßergebnisse von zwei Kulturen. In Klammern: Relativwerte (Kontrolle = 100 %).

Pulszeit (h)	Ipm/mg Protein			
	Kontrolle	Nor-N-LOST (50 µg/ml)	Stickstoff - LOST (0.5 µg/ml)	M-cyclophosphamid (1.0 µg/ml)
0 - 6	14 560 (100) ± 872	9 443 (65) ± 561	2 715 (19) ± 119	15 196 (100) ± 405
7 - 13	15 997 (100) ±1 180	4 373 (27) ± 724	3 083 (19) ± 402	10 427 (64) ± 572
14 - 20	22 341 (100) ± 196	3 883 (17) ± 117	3 355 (15) ± 416	6 167 (28) ± 114

Tabelle 7 a: ^{14}C-Thymidin-Einbau

Pulszeit (h)	Ipm/mg Protein			
	Kontrolle	Nor-N-LOST (50 µg/ml)	Stickstoff-LOST (0.5 µg/ml)	M-cyclophosphamid (1.0 µg/ml)
0 - 6	38 856 (100) ±2 353	36 443 (94) ±2 069	21 072 (54) ±1 784	37 562 (97) ± 432
7 - 13	37 163 (100) ±4376	34 867 (94) ±2 097	15 418 (41) ± 980	36 707 (99) ± 198
14 - 20	35 621 (100) ±4 345	26 713 (75) ±2 477	17 088. (48) ±1 421	32 640 (92) ±3 537

Tabelle 7 b: ^{14}C-Uridin-Einbau

Pulszeit (h)	Ipm/mg Protein			
	Kontrolle	Nor-N-LOST (50 µg/ml)	Stickstoff-LOST (0.5 µg/ml)	M-cyclophosphamid (1.0 µg/ml)
0 - 6	17 100 (100) ± 274	17 222 (100) ±1 032	12 393 (73) ± 705	17 296 (100) ± 793
7 - 13	16 826 (100) ± 548	16 171 (96) ± 820	8 093 (48) ± 443	17 723 (100) ± 935
14 - 20	20 964 (100) ± 673	18 953 (90) ± 467	7 785 (37) ± 1	20 802 (100) ±1 097

Tabelle 7 c: ^{14}C-Leucin-Einbau

Abb. 7 :

Einbauraten von ^{14}C-markiertem Thymidin (a), Uridin (b) und Leucin (c) in exponentiell sich vermehrende Ehrlich-Ascites-Zellkulturen während verschiedener Intervalle (0 - 6, 7 - 13, 14 - 20 h) einer 20-stündigen Inkubation mit Nor-N-LOST (50 µg pro ml), Stickstoff-LOST (0,5 µg / ml) und M-cyclophosphamid (1,0 µg / ml). Mediumvolumen : 10 ml / Kultur.

Abszisse : Inkubationszeit bzw. Pulszeit (Pfeile) in Stunden.

Ordinate : Einbauraten in Prozent der Kontrollen.

■ Nor-N-LOST, ▲ Stickstoff-LOST,

● M-cyclophosphamid.

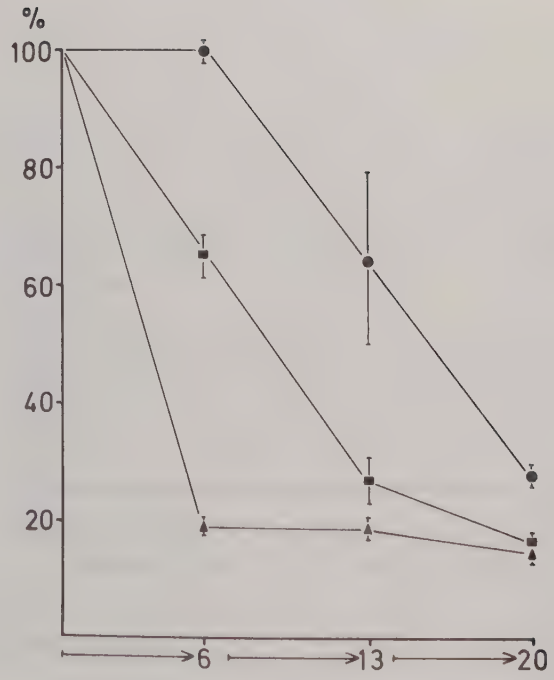


Abb. 7 a : Thymidin - Einbau

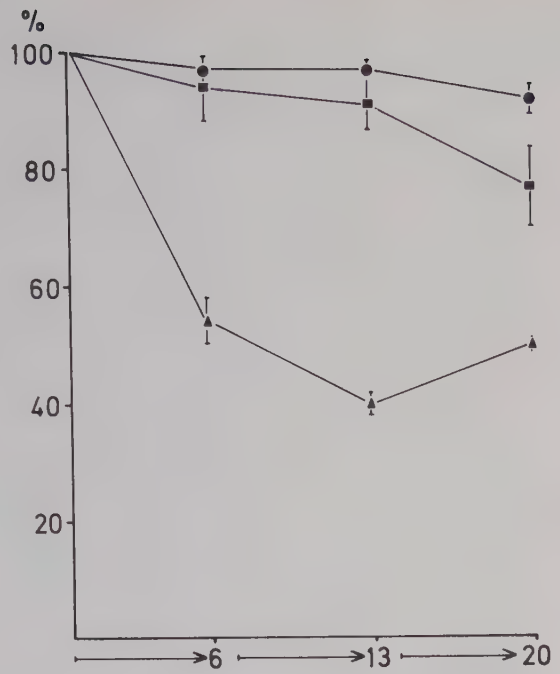


Abb. 7 b: Uridin - Einbau

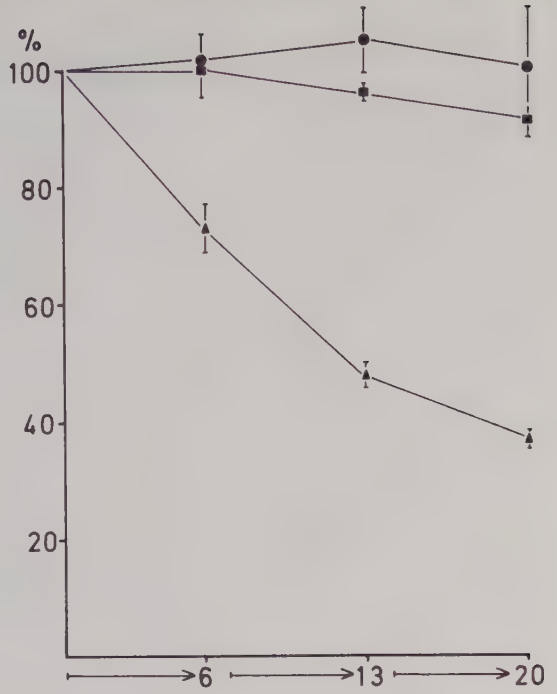


Abb. 7 c : Leucin - Einbau

Wie Abbildung 7 b und c zeigen, werden der Leucin- und Uridin-Einbau durch Nor-N-LOST (50 µg/ml), Stickstoff-LOST (0.5 µg/ml) und M-cyclophosphamid (1.0 µg/ml) in sehr ähnlicher Weise beeinflußt: Nor-N-LOST und M-cyclophosphamid hemmen den Einbau erst im letzten Zeitintervall (14 - 20 h) in geringem Maße, während es durch Stickstoff-LOST bereits innerhalb der ersten Pulszeit (0 - 6 h) zu einer stärkeren Hemmung kommt. Diese Hemmwirkung verstärkt sich im Falle des Leucin-Einbaus in der Folgezeit noch weiter, beim Uridin-Einbau ist das Maximum nach 6 Stunden schon nahezu erreicht.

Gegenüber diesen Übereinstimmungen im Leucin- und Uridin-Einbau treten beim Thymidin-Einbau (Tab. 7 a) charakteristische Unterschiede auf: Stickstoff-LOST hat bereits nach 6 Stunden Inkubationsdauer eine 80 proz. Hemmwirkung, die sich danach allenfalls geringfügig verstärkt. Dagegen zeigt M-cyclophosphamid nach 6 Stunden noch keinen Effekt; erst während des zweiten (7 - 13 h) und dritten (14 - 20 h) Zeitintervalls kommt es zu einer gleichmäßigen Zunahme der Hemmwirkung (ca. 70 % während der dritten Pulszeit). Nor-N-LOST nimmt auch hier wieder hinsichtlich des Wirkungseintritts und -maximums eine Mittelstellung ein.

4. Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen sollten einen Aufschluß über Teilaspekte (Protein- und Nukleinsäurebiosynthese) der Wirkung von drei cytostatischen Substanzen aus der Klasse der Stickstoff-LOST-Verbindungen geben, nämlich dem Bis-(ß-chloräthyl)-amin (Nor-N-LOST), N-methyl-bis-(ß-chloräthyl)-amin (Stickstoff-LOST HN_2) und dem primären, cytostatische aktiven Metaboliten des Cyclophosphamid (M-cyclophosphamid). Im Vordergrund der Fragestellung steht das M-cyclophosphamid, dessen Wirkungen hier erstmals unter Bedingungen der Zellkultur (des Ehrlich-Ascites-Tumors) untersucht wurden; Befunde über die inhibitorische Wirkung von Nor-N-LOST und Stickstoff-LOST auf Kulturen anderer Zelltypen liegen bereits vor [15]. Deshalb war auch von Interesse, ob die Substanzen auf Ehrlich-Ascites-Tumorzellkulturen die gleichen Wirkungen haben oder ob bezüglich Qualität und Dosisabhängigkeit Unterschiede bestehen.

Die zellulären Syntheseraten von Protein, DNS und RNS wurden durch Messung des Einbaus von ^{14}C-markiertem Leucin, Thymidin und Uridin bestimmt. Voraussetzung hierfür ist, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen der Einbau dieser Vorstufen tatsächlich ein Maß für diese Syntheseraten darstellt. Diese Voraussetzung ist dann im wesentlichen erfüllt, wenn

1.) die betreffende Vorstufe ausschließlich in die Synthese der betreffenden Makromoleküle eingeht, und

2.) zumindest für die Dauer der gewählten Inkubationszeit in ausreichender Menge und Konzentration zur Verfügung steht,

3.) wenn während dieser Zeit der Abbau des betreffenden Makromoleküls gegenüber der Synthese relativ gering ist.

In Übereinstimmung mit den Untersuchungen anderer Autoren [13] haben frühere quantitative Untersuchungen ergeben, daß eine direkte Proportionalität zwischen Zunahme der Zellzahl, DNS-, RNS- und

Proteingehalt einerseits und Zunahme des Einbaus von Thymidin, Uridin und Leucin andererseits besteht [36]. Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (vergl. 3.2 u. 3.4 mit 3.1 u. 3.6) haben diese Korrelation gezeigt, sodaß die Messung des Einbaus dieser radioaktiv markierten Vorstufen auch hier als Parameter der Protein- bzw. DNS- und RNS-Synthese angesehen werden darf.

Bei diesen Einbauexperimenten zeigte sich zunächst (Abb. 4 a - c), daß die drei Substanzen Hemmeffekte auf die DNS- und Protein-Synthese in sehr unterschiedlichen Konzentrationsbereichen bewirken. Die Konzentration halbmaximaler Hemmwirkung (ED_{50}) auf die DNS-Synthese (Thymidin-Einbau) beträgt bei Stickstoff-LOST 0.04 µg/ml, bei Nor-N-LOST 10 µg/ml und bei M-cyclophosphamid 0.9 µg/ml Medium. Es fiel jedoch auf, daß eine 50 proz. Hemmung der Proteinsynthese (Leucin-Einbau) bei allen drei Substanzen erst bei etwa zehnfach höheren Konzentrationen auftrat. Es gibt also Konzentrationsbereiche, in den die DNS-Synthese inhibitiert wird, während Proteinsynthese und, wie andere Experimente (s. 3.4) gezeigt haben, die RNS-Synthese nicht oder nur wenig unter den gewählten Versuchsbedingungen beeinträchtigt wurden. Andererseits zeigten die Dosis - Wirkungskurven, daß die maximale Hemmung des Leucin- und Thymidin-Einbaus bzw. der Proteinsynthese jeweils durch dieselbe und für jede Substanz charakteristische Konzentration erreicht wird. Diese Konzentration beträgt für Nor-N-LOST ca. 400 µg, für Stickstoff-LOST ca. 2.5 µg und für M-cyclophosphamid 15 - 25 µg/ml Medium. Diese Befunde können so gedeutet werden, daß die drei Substanzen in hohen Konzentrationsbereichen "undifferenziert" toxisch wirken, während in niedrigeren Bereichen vorwiegend die DNS-Synthese inhibiert wird.

Orientierende Untersuchungen haben ergeben, daß in den niedrigeren Konzentrationsbereichen eine Hemmung der DNS-Synthese (Hemmung

des Einbaus von ^{14}C-Thymidin) mit einer entsprechenden Reduzierung der Zellproliferation einhergeht. Es war deshalb auch zu erwarten, daß in Konzentrationsbereichen mit relativ stärkerer Inhibition der DNS-Synthese (im Vergleich zu Protein- und RNS-Synthese) die zellulären Gehalte an Protein und RNS ansteigen, was durch quantitative Bestimmungen von Protein, DNS und RNS bestätigt werden konnte. So wurde nach 20 und 40 Stunden Inkubation mit Nor-N-LOST (50 µg/ml), Stickstoff-LOST (0.5 µg/ml) und M-cyclophosphamid (2.0 µg/ml) eine gleichmäßige Zunahme des zellulären Proteingehaltes bis auf mehr als das Doppelte des Gehaltes der Kontrollen (cy. 210 µg/10^6 Zellen) nach 40 Stunden beobachtet (Tab. 3). Auch der RNS-Gehalt der Zellen stieg an, wie die RNS/DNS-Quotienten zeigten (Tab. 6). Der höchste Anstieg war hier bei Stickstoff-LOST zu verzeichnen.

Zu einem scheinbaren Widerspruch kann ein Vergleich zwischen den Syntheseraten des Nukleinsäure- und Proteinstoffwechsels und den entsprechenden Zuwachsraten im absoluten Gehalt führen; z.B. nahm trotz - zwar reduziertem - Leucin-Einbau der Proteingehalt der Kulturen nach Inkubation (20 h) mit Stickstoff-LOST (0.5 µg/ml) ab, und es kam unter den gleichen Inkubationsbedingungen zu einer Abnahme der Zellzahl und des Proteingehaltes der Kulturen, obwohl der Thymidin-Einbau noch 25 % der Kontrollen betrug (Abb. 3b). Dieser scheinbare Widerspruch kann dadurch erklärt werden, daß es hier zur Überlagerung mehrerer Effekte kam: Bei der quantitativen Bestimmung der Gehalte der Kulturen wurden jene Zellen nicht miterfaßt, die sich (infolge "Absterbens") im Laufe der Inkubationszeit von der Haftfläche abgelöst hatten und die im dekantierten Medium auch nachgewiesen werden konnten. Daß trotz Zell-, Protein- und DNS-Verlust weiterhin DNS-Synthese (Thymidin-Einbau) nachgewiesen wurde, - allerdings - stark vermindert im Vergleich mit Kontrolle, könnte auch auf resistente Zel-

len oder eine Veränderung der Wirksamkeit der Substanzen bei fortdauernder Inkubation zurückgeführt werden.

Wenn man vereinfacht sagt, daß eine letale Cytotoxizität gleichbedeutend mit einem irreversiblen Zusammenbruch von essentiellen zellulären Syntheseleistungen wie DNS-, RNS- und Protein-Synthese ist, und cytostatische Wirkung Weiterleben der Zelle bei reduzierter oder aufgehobener Teilungsfähigkeit der Zelle bedeutet, dann scheint bei Betrachtung der Wirkung der untersuchten Substanzen auf die Zellvermehrung das M-cyclophosphamid die Bedingungen einer cytostatischen Substanz am ehesten zu erfüllen. Unter den gewählten Versuchsbedingungen (Inkubation mit Substanzkonzentration halbmaximaler Hemmung der DNS-Synthese) zeigte sich bei Nor-N-LOST und besonders bei Stickstoff-LOST ein Überwiegen der toxischen Effekte, die sich im 'Absterben" der Kultur auswirken (Absinken der Zellzahl unter den Ausgangswert). Demgegenüber nahm nach Inkubation mit M-cyclophosphamid die Zellzahl während der ersten 20 Stunden um ca. 40 % zu und war noch nach 40 Stunden auf diesem Niveau geblieben. Diese anfängliche Zellvermehrung könnte z. B. dadurch erklärt werden, daß diese Substanz in einer bestimmten Phase des Zellcyclus hemmend "angreift". Eine andere, fast wahrscheinlichere Erklärung wäre ein verzögerter Wirkungseintritt von M-cyclophosphamid (s. u. 3. 6). Diese Aussagen über die Toxizität wurden durch die Bestimmung der Trypanblau-Färbbarkeit (Tab. 4) bestätigt, mit der irreversibel membrangeschädigte ("absterbende") Zellen kenntlich gemacht werden. Der Anteil dieser Trypanblau-positiven Zellen blieb auch nach vierzigstündiger Inkubation mit M-cyclophosphamid im Normbereich, während er bei Nor-N-LOST und Stickstoff-LOST mit zunehmender Inkubationszeit umso größer wurde, je mehr Zellverlust ("Absterben") auftrat (vergl. Tab.

4 und Abb. 5 a). Allerdings sollte noch in zukünftigen Experimenten geprüft werden, ob nicht auch bei höheren M-cyclophosphamid-Konzentrationen "irreversible cytotoxische" Effekte auftreten.

Während bisher zelluläre Veränderungen in Gehalt bzw. der Synthese von DNS, RNS und Protein nach Langzeiteinwirkung (20 oder 40 Stunden) der Substanzen beschrieben und diskutiert wurden, waren nun die Ergebnisse einer Pulsmarkierung mit ^{14}C-markiertem Thymidin, Leucin und Uridin innerhalb verschiedener Intervalle während der ersten 20 Stunden in Gegenwart der Substanzen von besonderem Interesse, denn in einem solchen Experiment können Unterschiede im zeitlichen Eintritt oder Verlauf der Hemmwirkungen auf DNS-, RNS- und Proteinsyntheseraten während eines relativ kurzen Zeitintervalls analysiert werden. Die Ergebnisse dieser Pulsmarkierung (Abb. 7) stehen in prinzipiellen Übereinstimmung mit den quantitativen Bestimmungen der DNS-, RNS- und Proteingehalte. Es zeigte sich nämlich, daß der Uridin- und Leucin-Einbau bedeutend weniger bzw. relativ später betroffen wurde als der Thymidin-Einbau, was mit der Anhäufung von Protein und RNS in den behandelten Kulturen übereinstimmt (Tab. 6).

Die Pulsmarkierung mit ^{14}C-Thymidin (DNS-Synthese) zeigte jedoch deutliche Unterschiede zwischen diesen Substanzen bezüglich des zeitlichen Wirkungseintritts der Hemmwirkungen. Während in Gegenwart von Stickstoff-LOST und Nor-N-LOST bereits nach 6 Stunden eine starke Hemmung des Thymidin-Einbaus festzustellen war, zeigte das M-cyclophosphamid nach sechsstündiger Inkubation noch keine Wirkung. Eine deutliche Hemmung durch M-cyclophosphamid trat erst im Zeitintervall 7 - 13 Stunden auf. Eine mögliche Erklärung für diesen verzögerten Wirkungseintritt des M-cyclophosphamids könnte durch Unterschiede in der Kinetik des Übergangs der M-cyclophosphamid in die eigentliche Wirkform ("ultimate toxic agent") bedingt sein [25].

Der gleichartige Verlauf ihrer Dosis-Wirkungskurven, den die drei Substanzen in allerdings unterschiedlichen Konzentrationsbereichen zeigten, scheint die Annahme zu unterstützen, daß die beschriebenen Unterschiede hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Nukleinsäure und Proteinsynthese bzw. Zellproliferation nicht so sehr in einem unterschiedlichen Reaktionsmechanismus, sondern in der Reaktionskinetik bzw. Reaktivität zu suchen sind.

Ursachen für eine unterschiedliche Reaktivität könnte im Unterschied der Permeabilität, Aktivierung oder Bindung am Wirkort (Zellmembran oder intrazelluläre Wirkmoleküle wie Nukleinsäure, Protein etc.) gesucht werden. Weitere Untersuchungen könnten hier ansetzen.

5. Zusammenfassung

Die Wirkung von Bis-(ß-chloräthyl)-amin (Nor-N-LOST), N-methyl-bis-(ß-chloräthyl)-amin (Stickstoff-LOST, HN_2) und dem primären, cytostatisch aktiven Metaboliten des Cyclophosphamids (Abkürzung: M-cyclophosphamid; chemische Bezeichnung: N-bis-(ß-chloräthyl)-phosphorsäurediamid-O-(ß-formyläthyl)-ester) auf die Nukleinsäure- und Proteinsynthese und die Zellproliferation von Ehrlich-Ascites-Zellkulturen (permanente Monolayer-Kulturen) in der expotentiellen Vermehrungsphase wurde untersucht. Als Kulturmedium diente Eagle's Basal Medium mit Zusatz von 10 % fötalem Kalbsserum.

Für alle drei Substanzen gab es Konzentrationsbereiche, in denen die DNS-Synthese (gemessen am Einbau von ^{14}C - Thymidin) schon gehemmt wurde, während Proteingehalt und -synthese (gemessen am Einbau von ^{14}C-Leucin) nahezu unbeeinflußt waren. Die Konzentration halbmaximaler Hemmung der DNS-Synthese lag bei Nor-N-LOST um 10 µg, bei Stickstoff-LOST um 0.04µg und bei M-cyclophosphamid um 0.9 µg pro ml Medium, die Konzentrationen für halbmaximale Proteinsynthesehemmung lagen jeweils um ca. eine Zehnerpotenz höher. Eine vollständige Hemmung der DNS-Synthese (wobei gleichzeitig der Leucin-Einbau völlig gehemmt wurde) trat in folgenden Konzentrationsbereichen ein: 100 - 1000 µg Nor-N-LOST, 1 - 10 µg Stickstoff-LOST und 10 - 100 µg M-cyclophosphamid pro ml Medium. Zwischen diesen Konzentrationsbereichen und der Konzentration, bei der sich erste Anzeichen einer Inhibition des Thymidin-Einbaus zeigten, lagen bei allen drei Substanzen etwa zwei Zehnerpotenzen.

Nach Inkubation von Zellkulturen mit den drei Substanzen in Konzentrationen, die halbmaximale Hemmwirkung auf die DNS-Synthese bewirkten, kam es durch Nor-N-LOST und Stickstoff-LOST zum allmählichen "Absterben" der Zellen und zunehmender Membranschädigung (Trypanblau-Färbbarkeit); M-cyclophosphamid bewirkte zunächst (0 - 20 h Inkubation) eine Reduzierung der Zellvermehrung, anschließend (20 - 40 h) blieb die Zellzahl/Kultur konstant. Dabei blieb die Trypanblau-Färbbarkeit im Normbereich.

Unter denselben Inkubationsbedingungen (ED_{50} der Hemmung des Einbaus von Thymidin) kam es in Gegenwart aller drei Substanzen zu einem Anstieg der zellulären Protein- und RNS-Gehalte auf etwa das Doppelte.

Pulsmarkierungen mit ^{14}-C-markiertem Thymidin, Leucin und Uridin während einer zwanzigstündigen Inkubation mit Nor-N-LOST (50 µg/ml), Stickstoff-LOST (0.5 µg/ml) und M-cyclophosphamid (1.0 µg/ml) ergaben, daß die RNS- und Proteinsynthese durch Nor-N-LOST und M-cyclophosphamid erst im letzten Zeitintervall (14 - 20 h) gering gehemmt wurde, während Stickstoff-LOST von Anfang an eine Hemmung bewirkte. Dagegen war die DNS-Synthese in Gegenwart von Stickstoff-LOST und Nor-N-LOST bereits nach 6 Stunden deutlich gehemmt, während M-cyclophosphamid erst im Zeitintervall 7 - 13 Stunden eine Wirkung zeigte. Als mögliche Ursachen dieses verzögerten Wirkungseintritts wurden Unterschiede der "Aktivierung", Permeabilität oder Bindung am Wirkort diskutiert.

6. Literaturverzeichnis

1. Arnold, H., F. Bourseaux und N. Brock: Neuartige Krebs-Chemotherapeutika aus der Gruppe der zyklischen N-Lost-Phosphamidester. Naturwiss. 45, 64 - 66 (1968)

2. Arnold, H. und F. Bourseaux: Synthese und Abbau cytostatisch wirksamer cyclischer N-Phosphamidester des Bis-(ß-chloräthyl)-amins. Agew. Chem. 70, 539 - 544 (1958)

3. Bayreuther, K.: Chromosomenbestand des Ehrlich-Ascites-Tumors in der Maus. Z. Naturf. 7 b, 554 - 557 (1952)

4. Bray, G. A.: A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid-sintillator - counter. Anal. Chem. 1, 279 - 285 (1960)

5. Brock, N.: Zur pharmakologischen Charakterisierung zyklischer N-Lst-Phosphamidester als Krebs-Chemotherapeutika. Arzneim.-Forsch. 8, 1 - 9 (1958)

6. Brock, N.: Therapiewoche 21, 1041 (1964)

7. Brock, N. und H.-J. Hohorst: Über die Aktivierung von Cyclophosphamid im Warmblüterorganismus. Naturwiss. 49, 610 - 611 (1962)

8. Brock, N. und H. J. Hohorst: Über die Aktivierung von Cyclophosphamid in vivo und in vitro.
Arzneim.-Forsch. 13, 1021 - 1031 (1963)

9. Burton, K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetic estimation of deoxy-ribonucleic acid.
Biochem. J. 62, 315 - 323 (1956)

10. Caspersson, T., S. Farber, G. E. Foley, D. Killander and A. Zetterberg: Cytochemical evaluation of metabolic inhibitors in cell culture.
Exptl. Cell Res. 39, 365 - 385 (1965)

11. Ceriotti, G.: Determination of nucleic acids in animal tissues.
J. Biol. Chem. 214, 59 - 70 (1955)

12. DeCosse, J. J. and S. Gelfant: Effects of Nitrogen mustard during the cell cycle of the Ehrlich-Ascites tumor.
Exptl. Cell Res. 60, 185 - 190 (1970)

13. Eagle, H. and L. Levintow: Amino acid and protein metabolism. I. The metabolic characteristics of serially propagated cells.
In: Cell and Tissues in Culture. Vol. 1. 277 - 296 (1965); ed. by E. N. Willmer, Academix Press, New York

14. Earle, W. R.: J. Natl. Cancer Inst. 4,167 (1943)

15. Eaton, M. D., A. R. Scala and M. Jewell: Cancer Res. 19, 945 - 953 (1959)

16. Ehrlich, P.: Ueber die Beziehung von chemischer Constitution, Vertheilung und pharmakologischer Wirkung (1898).
In: The Collected Papers of Paul Ehrlich.
F. Himmelweit, Ed. 1, 570 - 595 (1956)
Pergamon Press, New York, N. Y.

17. Foley, G. E., O. M. Friedman and B. P. Drolet: Studies on the Mechanism of Action of Cytoxan, Evidence of Activation in Vivo and in Vitro.
Cancer Res. 21, 57 - 63 (1961)

18. Friedman, O. und F. Boger:
Anal. Chem. 33, 906 (1961)

19. Friedman, O. M. and A. M. Seligman:
J. Amer. chem. Soc. 76, 658 (1954)

20. Friedman, O. M. and A. M. Seligman:
J. Amer. chem. Soc. 76, 655 (1954)

21. Gilman, A. and F.S. Philips: The biological actions and therapeutic applications of the ß-chloroethyl amines and sulfides.
Science 103, 409 - 415 (1946)

22. Gilman, A.: The initial clinical trial of nitrogen mustard.
Amer. J. Surg. 105, 574 - 578 (1963)

23. Gross, R. und K. Lambers: Vorläufige klinische Beobachtungen mit einem neuen N-Lost-Phosphamid-ester in der Tumortherapie.
Naturwiss. 45, 66 (1958)

24. Hess, H.: Dissertation Med. Fakultät Marburg (1972)

25. Hohorst, H.-J.: Proc. X. Int. Canc. Cong. Houston 1971, Oncolgy.

26. Hohorst, H.-J., A. Ziemann und N. Brock: Alkylierende Substanzen in Serum und Urin nach Injektion von Cyclophosphamid.
Arzneim.-Forsch. 15, 432 - 434 (1965)

27. Hohorst, H.-J., A. Ziemann und N. Brock: 4-Ketocyclophosphamide, a Metabolite of Cyclophosphamide.
Arzneim.-Forsch. 21, 1254 - 1257 (1971)

28. Hohorst, H.-J., A. Ziemann, H. Hess und N. Brock: in Vorbereitung

29. Ishidate, M., K. Kabayashi, Y. Sakuray and T. Yoshida: Proc. Japan Acad. 27, 493 (1951)

30. Klatt, O., J. S. Stehlin Jr., C. McBridge and A. C. Griffin: The Effect of Nitrogen Mustard Treatment on the Deoxyribonucleid Acid of Sensitive and Resistant Ehrlich Tumor Cells.
Cancer Res. 29, 286 - 290 (1969)

31. Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr and R. J. Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Bio. Chem. 193, 265 - 275 (1951)

32. Melander, Y.: The role of a secondary constriction of a tumor chromosome.
Hereditas 49, 241 - 273 (1963)

33. Meyer, V.: Medicinisch-chemische Notizen. II. Physiologische Wirkung der gechlorten Schwefelaethyle. Ber. 20, 1729 - 1731 (1887)

34. Oyama, V. I., and H. Eagle: Measurement of cell growth in tissue culture with a phenol reagent (Folin-Ciocalteau). Proc. Soc. exp. Bio. Med. 91, 305 - 307 (1956)

35. Ross, W. C.: Biological alkylating agents. Butterworth, London (1962)

36. Schachtschabel, D.: Biochemische und cytologische Untersuchungen zum Stoffwechsel, Zur Teilung und Differenzierung von Zellen des Harding-Passey-Melanoms und Ehrlich-Ascites-Tumorzellen in Zellkultur. Habilitationsschrift zur Erlangung der venia legendi, Marburg (1969)

37. Schachtschabel, D. and J. J. Ferro: The effect of 4-aminopyrazolo (3, 4-d) pyrimidine and guanine on Ehrlich ascites cells in culture. Exptl. Cell Res. 48, 319 - 326 (1967)

38. Schachtschabel, D., D. Killander, A. Zetterberg, R. E. McCarthy and G. E. Foley: Effects of 4-aminopyrazolo (3, 4-d) pyrimidine in combination with guanine on nucleic acid and protein synthesis by Ehrlich ascites cells in culture. Exptl. Cell Res. 50, 73 - 80 (1968)

39. Schmähl, D. und H. Druckrey: Beiträge zum Wirkungsmechanismus von N-Oxyd-Lost.
Naturwiss. 43, 199 (1956)

40. Sonneborn, M.: Untersuchungen zum Metabolismus von Cyclophosphamid: Isolierung und Synthese des primären Metaboliten.
Dissertation Nat. Fakultät, Marburg (1969)

41. Udenfriend, S., C. T. Clark, J. Axelrod and B. B. Brodie: Ascorbic acid in aromatic hydroxylation. I. A model system for aromatic hydroxylation.
J. Biol. Chem. 208, 731 - 739 (1954)

Anerkennung

Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. H.-J. Hohorst danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und die Überlassung des Themas.

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. D. Schachtschabel für die Überlassung des Arbeitsplatzes, seine Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Experimente sowie für seine ständige Anregung, Kritik und Förderung,

Frau Hilve Bonner und meiner Frau Helga Roßbach für die besonders sorgfältige und zuverlässige technische Mitarbeit sowie Fräulein J. Sprengel für das Schreiben der Arbeit.

Lebenslauf

Am 12. September 1943 wurde ich als Sohn des Apothekers Dr. Fritz Roßbach und seiner Ehefrau Ottilie, geb. Bücher in Laubach, Kreis Gießen geboren.

Von 1950 bis 1953 besuchte ich die Grundschule und anschließend neun Jahre den humanistischen Zwei der Paul-Gerhardt-Schule in Laubach, wo ich 1962 die Reifeprüfung ablegte.

Mit dem Sommersemester 1962 begann ich das Medizinstudium an der Philipps - Universität in Marburg, wo ich 1963 die naturwissenschaftliche und 1965 die ärztliche Vorprüfung ablegte. Die klinischen Semester verbrachte ich in Wien und Marburg, wo ich im Frühjahr 1969 das Staatsexamen bestand.

Seit Juli 1969 bin ich, zunächst als Medizinalassistent, später als wissenschaftlicher Angestellter, am Institut für Physiologische Chemie II der Philipps - Universität in Marburg tätig, wo auch die vorliegende Arbeit entstand.

Marburg, Juni 1972

Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren und Dozenten

in Marburg: Becker, Blum, Bommer, Brück, Bücher, Buchholz, Dimroth, Dölle, Dorer, Drawert, Exner, Gedigk, Hamm, Hartmann, Hensel, Herrmann, Heuser, Hildebrandt, Hohorst, Jacob, Karlson, Knauff, Kreutz, Lang, Linneweh, Löhr, Lübbers, Mahr, Mann, Martini, Mattes, du Mesnil, Niessing, Petry, Rodeck, Roger, Rohen, Rupex, Salfeld, Seidel, Siegert, Siess, Schleyer, Schmid, Straub, Streicher, Schwaiger, Thoenes, Vogt, Voß, Wendt, Walcher, Würterle,

und in Wien: Artner, Deutsch, Fellinger, Hruby, Kunz, Moritsch, Novotny, Obiditsch - Mayer, Wiedmann.